

ULL

Universidad
de La Laguna

Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular y Genética



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA

Development of a technique to determine genetic haplotypes using real-time PCR

Puesta a punto de un ensayo para la
determinación de haplotipos genéticos en
una plataforma de PCR a tiempo real

Trabajo de Fin de Grado

Claudia Lorenzo Palenzuela

Julio, 2015

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015	ENTRADA Fecha: 08/07/2015 Núm:
--	---

Datos Personales



Nº DNI o pasaporte: 78649434 Z	Nombre y Apellidos: Claudia Lorenzo Palenzuela
Teléfono: 658 45 20 40	Dirección de correo electrónico: clau_lorens@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

"Puesta a punto de un ensayo para la determinación de haplotipos genéticos en una plataforma de PCR a tiempo real"
--

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D. José Antonio Pérez Pérez	
Profesor del Departamento de Bioquímica, Microbiología, biología celular y Genética	
y Dña. Ruth Ramos Díaz	
Técnica Investigadora del servicio de Farmacia del HUC, FUNCANIS	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
	
Fdo.: José Antonio Pérez Pérez	Fdo.: Ruth Ramos Díaz

La Laguna , a 8 de julio de 2015

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BI OLOGÍA

Resumen

La farmacogenética es una rama de la farmacología que pretende predecir la respuesta y toxicidad a diversos medicamentos en función de la variabilidad genética entre los individuos (Wheeler *et al.*, 2013). Muchos *loci* genéticos están siendo estudiados actualmente por su potencial valor predictivo, pero todavía no se dispone de datos sobre la prevalencia de ciertas mutaciones en la población canaria. En este contexto, el objetivo del presente trabajo ha sido determinar el genotipo de 148 pacientes del Hospital de Día de Oncología para varios marcadores localizados en el gen *UGT1A7* mediante una plataforma de PCR a tiempo real empleando sondas de hibridación, con el propósito de identificar los haplotipos UGT1A7*1, UGT1A7*2, UGT1A7*3 y UGT1A7*4, ya que guardan relación directa con el riesgo de intoxicación por irinotecán, un fármaco comúnmente utilizado en el tratamiento de cáncer colorrectal. Durante estos ensayos rutinarios fueron apareciendo individuos dobles heterocigotos en los que no era posible definir su haplotipo, y por tanto suscitaban incertidumbre en relación a la toxicidad, razón por la cual se ha puesto a punto un ensayo basado en PCR específica de alelo con el fin de resolver la ambigüedad de fase. Los resultados demuestran que se trata de una técnica rápida, fiable y trasladable a la práctica clínica.

Palabras clave: AS-PCR, farmacogenética, *HybProbe*, irinotecán, PCR a tiempo real.

Abstract

Pharmacogenetics is a branch of pharmacology dedicated to predict response to drug treatments, according to the individual genetic variability (Wheeler *et al.*, 2013). There are some genetic loci that they have been analyzed due to their predictive value, but there are not enough information about the prevalence of many genetic mutations in the canarian population. In this way, the aim of this paper is to determinate the genotype of 148 samples of patients from the Hospital de Día de Oncología, looking for some mutations located in *UGT1A7* gene, by means of real-time PCR using hybridization probes, with the purpose of identify UGT1A7*1, UGT1A7*2, UGT1A7*3 y UGT1A7*4 haplotypes, because they are related with irinotecan toxicity risk, a drug commonly used in the colorectal cancer treatment. In these ordinary assays, we have found double heterozygous samples with unknown haplotypes, so this led to uncertainty about toxicity. For this reason we have developed a technique based on allele-specific PCR with the aim of resolve this problem. The outcome on the present work is a fast, reliable technique that can be translated to the clinical field.

Key words: AS-PCR, *HybProbe*, irinotecan, pharmacogenetics, real-time PCR.

Índice

1. Introducción.....	5
1.1. Descripción del gen analizado y haplotipos posibles	6
2. Material y métodos	8
2.1. Población de estudio.....	8
2.2.Extracción de ADN genómico	8
2.3. PCR a tiempo real	9
2.3.1. Tecnología HybProbe®(Roche).....	9
2.3.2. Diseño de sondas y cebadores	11
2.3.3. Perfil térmico estándar	12
2.3.4. Análisis	12
2.3.5. PCR específica de alelo (AS-PCR).....	14
2.4. Técnicas de genotipado y haplotipado.....	15
2.4.1. Ensayos de genotipado mediante PCR a tiempo real.....	15
2.4.2. Resolución de haplotipos en dobles heterocigotos	16
2.4.2.1. Prueba de cebadores específicos de alelo en PCR convencional.....	16
2.4.2.2. Optimización del uso de cebadores específicos de alelo en PCR a tiempo real	17
2.4.2.3. Obtención artificial de una muestra conhaplotipo conocido	18
2.4.2.4. Resolución de las muestras problema: dobles heterocigotos.....	18
2.4.3. Cribado de una muestra poblacional aleatoria.....	18
3. Resultados y discusión	19
3.1. Ensayos de genotipado mediante PCR a tiempo real	19
3.2. Resolución de haplotipos en dobles heterocigotos.....	20
3.3. Cribado de una muestra poblacional aleatoria	25
3.4. Frecuencias alélicas.....	27
4. Conclusiones.....	28
5. Bibliografía.....	29

1. Introducción

El cáncer colorrectal (CRC) es el tercer cáncer más común tanto en hombres como en mujeres, y la tercera causa de muerte relacionada con cáncer (Jemal *et al.*, 2004). Un medicamento muy utilizado frente a este tipo de cáncer es el irinotecán, siendo actualmente parte del tratamiento estándar frente a cáncer de colon o recto avanzados (Douillard *et al.*, 2000).

Este fármaco es un derivado semisintético de la camptotecina administrado por vía intravenosa, que actúa principalmente como inhibidor de la topoisomerasa I, enzima que estabiliza la estructura del ADN durante su replicación y transcripción (Creemers *et al.*, 1994). Al resultar inhibida dicha enzima, se generan fragmentos de cadenas simples de ADN, lo que conlleva la interrupción de la división celular y finalmente la muerte de las células que se encuentran en esta fase (Valenzuela *et al.* 2013).

Una vez en el organismo, el irinotecán es metabolizado en el hígado por carboxilesterasas, dando lugar a metabolitos activos denominados SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina) que ejercen la acción inhibidora del ciclo celular. Estos metabolitos son luego glucuronizados de manera extrahepática por las uridina difosfato glucuronosiltransferasas 7, transformándolos en metabolitos inactivos o SN-38G que son excretados finalmente hacia el intestino. De esta manera, las glucuronosiltransferasas juegan un papel clave en la regulación y eliminación del SN-38. Teniendo en cuenta lo anterior, los pacientes que presenten alteraciones en los genes codificadores de estas enzimas, sufrirán cambios en la actividad de glucuronidación. En aquellos casos en los que esta actividad resulte disminuida, los metabolitos activos permanecerán por un tiempo más prolongado en la circulación sistémica, hecho que se ha relacionado directamente con la alta toxicidad del irinotecán (Tziotou *et al.*, 2014)

La bibliografía expone ampliamente la asociación existente entre el grado de toxicidad y algunos polimorfismos genéticos localizados en el gen *UGT1A7*, destacando la presencia del alelo *UGT1A7*3* como uno de los factores de riesgo más importantes (Carlini *et al.*, 2005; Cecchin *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009), ya que provoca un descenso relevante en la actividad de glucuronidación (Strassburg *et al.*, 2002; Tziotou *et al.*, 2014).

Por último, cabe mencionar que los efectos adversos causados por estos procesos de intoxicación resultan de diversa índole. Por un lado, destacan los efectos hematológicos como

leucopenia, neutropenia, anemia o trombocitopenia, y por otro lado, los síntomas no hematológicos: diarrea, dolor abdominal, anorexia, alopecia, fatiga, vómitos o estomatitis (Park *et al.*, 2011)

1.1. Descripción del gen analizado y haplotipos posibles

El gen *UGT1A7* (UDP glucuronosiltransferasa familia 1, polipéptido A7) en *Homo sapiens* se encuentra ubicado en el cromosoma 2q37, con una extensión de 2333 pb y 5 exones. Se trata de una isoforma del gen *UGT1A* que se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal y que codifica las nombradas glucuronosiltransferasas que se localizan en el retículo endoplasmático y que llevan a cabo los procesos de glucuronidación (Di *et al.*, 2009). De esta manera, catalizan la conversión de los sustratos hidrofóbicos a ácidos hidrofóbicos β-D-glucopiranosidurónicos, con el fin de eliminarlos con mayor facilidad vía biliar o intestinal (Strassburg *et al.*, 2002).

Existen cuatro haplotipos/alelos descritos en la bibliografía como *UGT1A7*1*, *UGT1A7*2*, *UGT1A7*3* y *UGT1A7*4* (Strassburg *et al.*, 2002), que se han generado a partir de tres SNPs (*Polimorfismo de Nucleótido Simple*), muy próximos entre sí (rs17868323, T>G; rs17863778, C>A; rs17868324, G>A), en combinación con un cuarto SNP (rs11692021, T>C), (Fig. 1 y Fig. 2). Dada la proximidad entre los tres primeros SNPs, de aquí en adelante se considerarán como un único locus.

Allele	128	129	130	131	132	207	208	209
<i>UGT1A7*1</i>	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	GTA	TGG	AAC
	F	N	D	R	K	V	W	N
<i>UGT1A7*4</i>	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	GTA	CGG	AAC
	F	N	D	R	K	V	R	N
<i>UGT1A7*2</i>	TTT	AAG	GAC	AAA	AAA	GTA	TGG	AAC
	F	K	D	K	K	V	W	N
<i>UGT1A7*3</i>	TTT	AAG	GAC	AAA	AAA	GTA	CGG	AAC
	F	K	D	K	K	V	R	N

Fig.1. Descripción de los alelos estudiados del gen *UGT1A7* según Strassburg. Nótese que los SNPs se localizan en la región codificadora del gen, afectando también a la secuencia de aminoácidos.

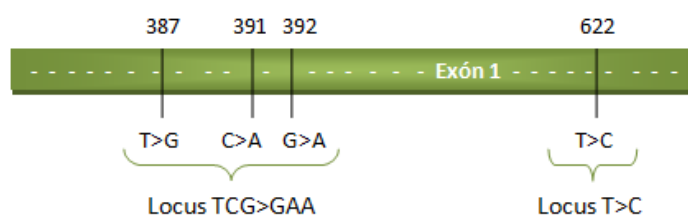


Fig.2. Disposición de los SNPs de interés en el gen *UGT1A7*. Nótese la cercanía entre ambos locus.

A su vez, la combinación de alelos en cada individuo dará lugar a diferentes grados de riesgo de intoxicación por irinotecán. De manera generalizada, se ha aceptado que el genotipo homocigótico UGT1A7*3 conlleva el riesgo más severo de intoxicación, mientras que la presencia de un solo alelo UGT1A7*3 determinaría un riesgo moderado, según algunos autores. Los demás haplotipos, hasta el momento, no se han relacionado con dicho riesgo (Carlini *et al.*, 2005; Tziotou *et al.*, 2014) (Tabla 1).

Locus TCG > GAA	Locus T>C	Haplotipo	Riesgo de intoxicación
G__AA/G__AA	C/C	*3/*3	Alto
G__AA/G__AA	C/T	*3/*2	Moderado
G__AA/G__AA	T/T	*2/*2	Bajo
T__CG/T__CG	T/T	*1/*1	Bajo
T__CG/T__CG	T/C	*1/*4	Bajo
T__CG/T__CG	C/C	*4/*4	Bajo
G__AA/T__CG	C/C	*3/*4	Moderado
G__AA/T__CG	T/C	*2/*4	Bajo
G__AA/T__CG	T/C	*1/*3	Moderado
G__AA/T__GC	T/T	*2/*1	Bajo

Tabla 1. Combinación de haplotipos posibles y riesgo de intoxicación asociado.

Tal y como se muestra en el recuadro verde de la Tabla 1, en los pacientes dobles heterocigotos no es posible por simple deducción la determinación de sus haplotipos, por lo que es importante disponer de herramientas adecuadas que ayuden a resolver en qué fase se encuentran los SNPs implicados, porque de ello dependerá el riesgo al que está expuesto el paciente.

Por otro lado debe comentarse que el mecanismo de toxicidad se fundamenta en cambios a nivel de proteína, a consecuencia de estos SNPs. Estos cambios, en su mayoría no sinónimos, podrían provocar una disminución de la actividad enzimática de la misma, lo que repercutiría en una capacidad de glucuronidación reducida (Tabla 2).

Mutación	Referencia NCBI	Polimorfismo	Posición en el gen	Efecto en proteína	Resultado del cambio
TCG →GAA	rs17868323	T > G	387	(Asn) =>(Lys)	No sinónima
	rs17863778	C > A	391	(Arg) =>(Arg)	Sinónima
	rs17868324	G > A	392	(Arg) =>(Gln)	No sinónima
T → C	rs11692021	T > C	622	(Trp) =>(Arg)	No sinónima

Tabla 2. Cambios a nivel de proteína provocados por los cuatro SNPs descritos.

En definitiva, la determinación de estos haplotipos como metodología rutinaria en los hospitales permitiría optimizar el tratamiento de cada paciente mediante el ajuste de dosis o sustituyendo el fármaco por otro alternativo.

En el presente trabajo se pretende, por un lado, la realización de ensayos de genotipado para los cuatro marcadores mencionados en la población de estudio mediante PCR a tiempo real con sondas FRET (*HybProbe*®; Ahsen *et al.*, 2000), y por otro lado, el diseño y puesta a punto de un método basado en PCR específica de alelo (ARMS; Newton *et al.*, 1989) para la resolución de los haplotipos en los pacientes dobles heterocigotos.

2. Material y métodos

2.1. Población de estudio

Se analizaron 148 muestras de sangre de pacientes de la Unidad de Oncología del Hospital Universitario de Canarias, suministradas desde diciembre de 2014. Todas las muestras fueron recogidas bajo consentimiento informado.

2.2. Extracción de ADN genómico

El material de partida que se ha utilizado para la extracción de ADN genómico (ADNg) procede de gotas de sangre capilar depositadas en tarjetas de papel de filtro y secadas a temperatura ambiente. El requisito para dar por buena una muestra es que el papel debe estar impregnado de sangre por ambas caras. El protocolo de obtención de ADNg es una modificación del método de extracción alcalina desarrollado por Rudbeck y Dissing (1998), muy simple en la práctica, económico y rápido. Los pasos a seguir son:

1. Precalentar el bloque térmico a 75°C.
2. Cortar un disco del papel con un diámetro aproximado de 3 mm utilizando un sacabocados y depositarlo en el fondo de un tubo de 0,5 ml. Limpiar la punta del sacabocados con papel y EtOH 96% entre una muestra y la siguiente.
3. Añadir 20 µl de NaOH 0,2 M asegurando que empapa el papel.
4. Incubar en el bloque térmico a 75°C, 5 minutos
5. Neutralizar con 180 µl de Tris-HCl 40 mM, EDTA 0,55 mM, pH 8,0.
6. Agitación enérgica, 30 segundos.
7. Centrifugar a 18.000 x g, 10 minutos.
8. Recuperar 170 µl del sobrenadante evitando el sedimento y transferir a un nuevo tubo de 0,5 ml.

En este punto las muestras de ADN_g ya están listas para usarse en ensayos de genotipado o haplotipado, pero si se desea conservarlas para analizarlas posteriormente, se procederá como sigue:

9. Congelar a -20°C, 24 horas.
10. Descongelar a temperatura ambiente y centrifugar a 18.000 x g, 5 minutos.
11. Transferir 150 µl del sobrenadante (sin sedimento) a un nuevo tubo.
12. Volver a congelar el extracto.

2.3. PCR a tiempo real

La técnica de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) tiene por objetivo la amplificación de un fragmento de ADN para generar múltiples copias del mismo. La variante de PCR a tiempo real, además, permite hacer un seguimiento a tiempo real de dicha amplificación, y el posterior análisis en un mismo tubo, disminuyendo el riesgo de contaminación por amplicones. En este trabajo se ha hecho uso de esta variante de la PCR empleando sondas de hibridación *HybProbe*®.

2.3.1. Tecnología HybProbe®(Roche)

Esta tecnología se basa en el diseño de dos oligonucleótidos marcados con fluoróforos (sondas) que han de unirse a secuencias adyacentes al ADN diana, de tal manera que ambos fluoróforos queden enfrentados a poca distancia entre sí (1-5 pb). Una de las sondas, denominada sensora, ha de ser complementaria a la región que contenga la variante genética (en este caso al SNP) y puede diseñarse tanto para la variante salvaje, como para la variante

mutante. La segunda sonda se denomina ancla, y debe unirse a una región invariable en las inmediaciones de la sonda sensora. Cuando se alcanza la temperatura de anillado, ambas sondas se unen al ADN con una proximidad tal que se produce el fenómeno de “Transferencia de Energía de Fluorescencia por Resonancia” (FRET) entre los fluoróforos, momento en el cual el sistema registra la señal. El principio de este fenómeno se basa en que tras la excitación de uno de los fluoróforos a una longitud de onda determinada, éste transfiere su energía al fluoróforo adyacente, el cual se excita y emite a una longitud de onda diferente que será registrada por el sistema de detección.

Es importante comentar que las sondas son reutilizadas en cada ciclo de amplificación, puesto que no son degradadas por la enzima ADN polimerasa, ni pueden extenderse debido a su carencia de un extremo 3' libre (Fig. 3.). El equipo utilizado como plataforma de PCR a tiempo real fue el LightCycler® 480, el cual permitió hacer el seguimiento durante el proceso de amplificación y también el análisis del registro de fluorescencia basado en temperatura de fusión, para identificar el genotipo de cada muestra.

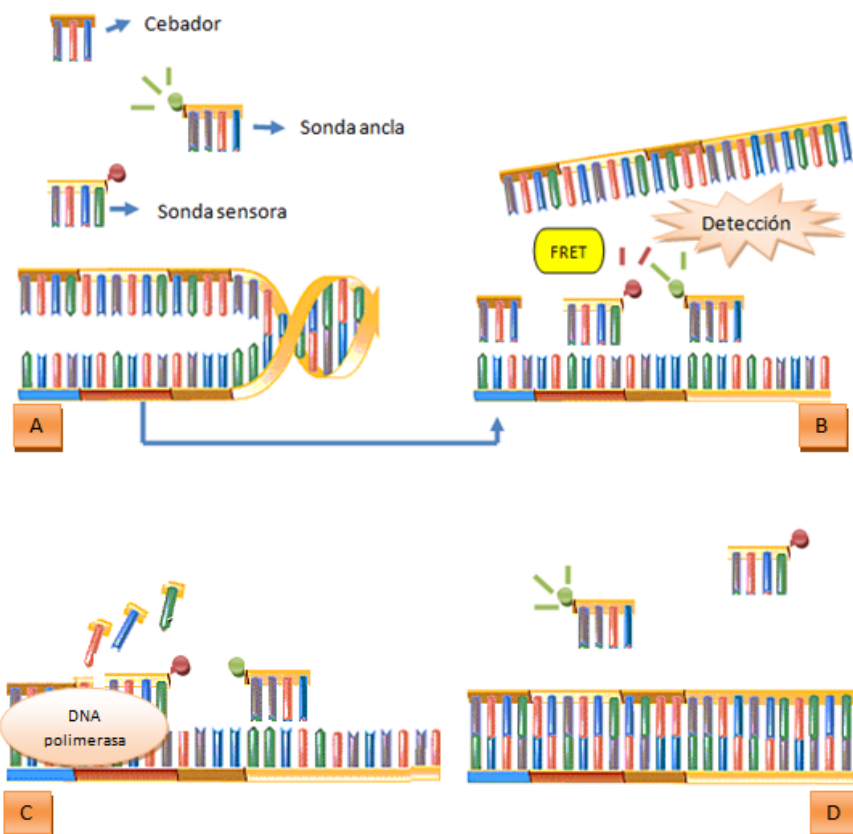


Fig. 3. Esquema que muestra los pasos que tienen lugar en un ciclo de PCR a tiempo real, usando tecnología HybProbe. A) Desnaturalización de la cadena de ADN. B) Unión de sondas y cebadores, momento en que se registrará la señal de fluorescencia. C) Unión de la enzima ADN polimerasa y elongación de la cadena. D) Terminación de elongación quedando las sondas libres para un nuevo proceso de amplificación.

2.3.2. Diseño de sondas y cebadores

Las sondas (Tabla 3) y cebadores (Tabla 4) fueron diseñados con el programa *Gene Runner*, previa descarga de la secuencia del gen UGT1A7a partir de la base de datos NCBI: *National Center for Biotechnology Information*. El diseño de los cebadores se realizó siguiendo las recomendaciones de Landt (2001). Las modificaciones químicas realizadas a los oligonucleótidos usados como sondas fueron:

- Incorporación de fluoresceína en posición 5' de la sonda ancla, y extremo 3' bloqueado con fosfato (P). Este fluoróforo se excita a 480 nm y transfiere su energía mediante fenómeno FRET al fluoróforo de la sonda sensora.
- Incorporación de Cy5 en posición 3' de la sonda sensora. Recibe la energía del anterior y emite a 670 nm.

Mutación	5'-Sonda ancla-3'	5'-Sonda sensora-3'	Forma reconocida
TCG → GAA	CTTAAAGGAGAGTTGTTTTGATGCAGTGT	GTTTGTTTAAGGACAAAATAATTAGTAGA	Mutante
		GTTTGTTTAATGACCGAAAATAATTAGTAGA	Salvaje
T → C	AAGTCATGGCGTCTGAGAACCCTAAG	ATGTGGTTCCATACTCTCTCCT	Salvaje
		ATGTGGTTCCGTACTCTCTCCT	Mutante

Tabla 3. Secuencia completa de las sondas diseñadas para detectar las mutaciones de interés. En rojo se han señalado los nucleótidos que confieren especificidad a las sondas sensoras.

Mutación	5'-Cebador directo-3'	5'-Cebador reverso-3'
TCG → GAA	GGGCAGGTTCTATCTGTACTTC	GTCTGGGGACATAGGAAAGAG
T → C	GCCTGTGGCTTAATTGTTG	GAGCTGCTTTATACAATTTGC

Tabla 4. Secuencia completa de los cebadores. Nótese que el diseño de los cebadores ha sido pensado para obtener dos amplicones: uno para el primer locus (TCG > GAA) y otro para el segundo locus (T > C).

2.3.3. Perfil térmico estándar

El perfil térmico de amplificación por PCR a tiempo real constó de 50 ciclos, en cada uno de los cuales tiene lugar una captura simple de fluorescencia. Estos ciclos culminan en una etapa denominada rampa de fusión, en la cual se produce un aumento progresivo de la temperatura (0,06°C/s) desde 40°C hasta 95°C, mientras se realiza una captura continua de fluorescencia (Fig. 4).

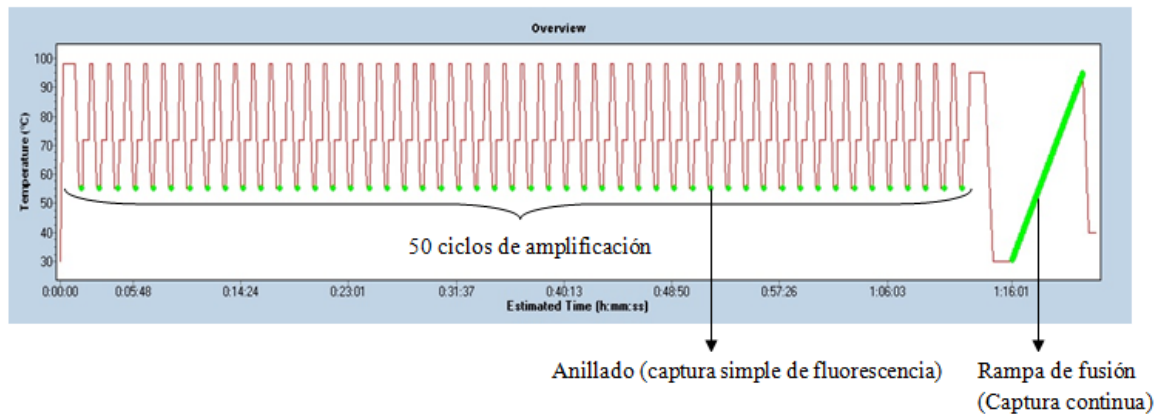


Fig. 4. Imagen del perfil térmico utilizado en los ensayos rutinarios.

1. Preincubación: 98°C – 30 segundos
2. Amplificación: 50 ciclos
 - 98°C – 5 segundos: Desnaturalización.
 - 55°C – 5 segundos: Anillado.
 - 72°C – 5 segundos: Extensión.
3. Fusión:
 - 95°C – 1 minuto
 - 40°C – 1,30 minutos } Rampa de fusión
 - 95°C
4. Enfriamiento: 40°C – 30 segundos

2.3.4. Análisis

El software del LightCycler® ofrece diferentes tipos de análisis, entre ellos el “análisis de fusión”, que permite estimar la temperatura de fusión (T_m ; *melting temperature*) del complejo formado entre el amplicón y la sonda sensora. Este parámetro se define como la temperatura a la cual la sonda dedica en promedio la misma cantidad de tiempo a estar asociada que disociada, y varía con el grado de afinidad de ésta por el amplicón. En este

sentido cabe destacar que la sonda sensora debe cubrir la posición del SNP de tal manera que ésta ocupe una posición centrada. Esto quiere decir que si la sonda se ha diseñado para que tenga una complementariedad del 100% con una de las variantes la interacción con dicha variante será más fuerte (T_m alta) que cuando la sonda no puede hibridar perfectamente (T_m baja), ya que aparece un “*mismatch*” o emparejamiento incorrecto que debilita esa interacción.

Para calcular la T_m , el sistema de detección registra la disminución de emisión de fluorescencia a medida que aumenta la temperatura de la mezcla de reacción durante la rampa de fusión, es decir, evalúa en qué rango de temperatura se separa la sonda del amplicón y cuál es la cinética de la disociación. Al representar gráficamente estos datos se obtiene una curva de tipo sigmoideal, pero al estimar el incremento negativo de la fluorescencia por incremento de temperatura, se transforma en un pico cuyo valor máximo corresponde al punto de inflexión del sigmoide, es decir, a la temperatura de fusión del complejo amplicón-sonda. Esto permite revelar cuál de los tres posibles genotipos posee una muestra. Por ejemplo, si empleamos la sonda que hibrida con la variante salvaje, un individuo homocigótico salvaje aparecerá como un solo pico (Fig. 5, A), mientras que si se trata de un homocigótico para el alelo mutante el pico aparecerá desplazado hacia la izquierda respecto al anterior (menor T_m) (Fig. 5, B). En el caso de un heterocigótico habrá un doble pico que deberá coincidir con los picos de los dos homocigotos (Fig. 5, C).

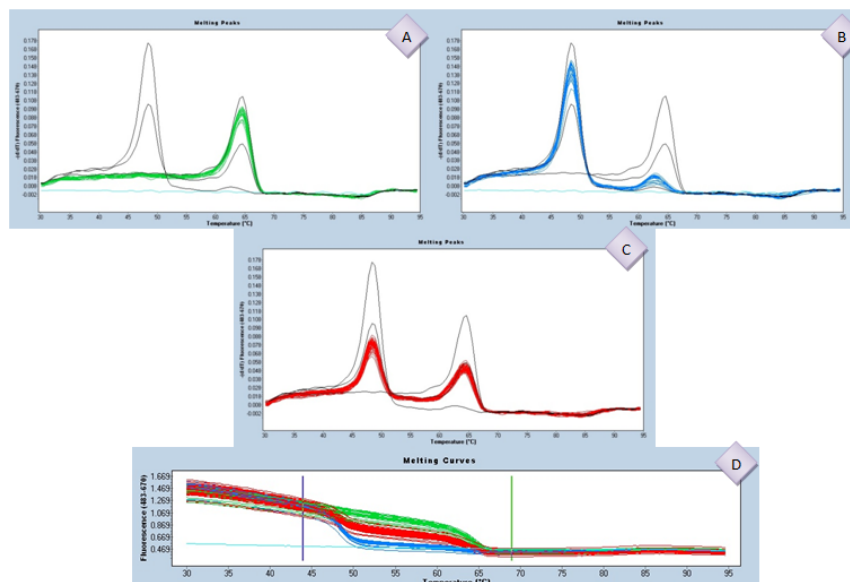


Fig. 5. Composición que muestra los diferentes picos resultantes tras el análisis de fusión empleando la sonda sensora salvaje para el locus TCG > GAA. Los picos de color gris representan patrones de genotipado. **A)** En verde, homocigóticos salvajes. **B)** En azul, homocigóticos mutantes. **C)** En rojo, heterocigóticos. **D)** Registro de la disminución de la fluorescencia con el aumento de temperatura durante la rampa de fusión.

Teniendo en cuenta estas nociones, será el diseño de cebadores y sondas, junto con el perfil térmico escogido, los elementos que determinarán la resolución (separación) de estos picos. Asimismo, es conveniente que la T_m de la sonda ancla sea 10°C mayor que la T_m de la sonda sensora, para que durante la etapa de rampa de fusión sea esta última la que se separe antes del amplicón, interrumpiendo así el fenómeno FRET. De esta manera el cálculo de la T_m dependerá solamente del comportamiento de la sonda sensora. Otro punto importante que hay que tener en cuenta a la hora del diseño son las estructuras secundarias que puedan generarse entre cebadores y sondas, ya que podría originar artefactos durante el transcurso de la PCR.

2.3.5. PCR específica de alelo (AS-PCR)

Esta técnica, que también puede emplearse en una plataforma de PCR a tiempo real, ha sido utilizada en el presente trabajo para la determinación de los haplotipos en aquellos pacientes dobles heterocigotos. Implica el uso de un cebador específico de alelo (ASP) que se unirá de forma selectiva al locus para el cual está diseñado, en combinación con un cebador conservado. En este estudio se ha optado por emplear uno específico para la variante TCG (cebador ASP-TCG) y otro para GAA (cebador ASP-GAA), ya que ambos cebadores abarcan los tres SNPs cerca de su extremo 3' y se esperaría por tanto una buena discriminación entre una variante y la otra (Fig. 6). El diseño final de los cebadores se muestra en la Tabla 5, y los detalles experimentales se explican en el apartado 2.4.2 de esta sección.

Nombre	Cebador específico de alelo	Forma reconocida
ASP-GAA	CAGGAGTTTGTTTAAGGACAA	Mutante
ASP-TCG	AGGAGTTTGTTTAATGACCG	Salvaje

Tabla 5. Secuencias de los cebadores específicos de alelo para las variantes TCG y GAA. En rojo se han resaltado las posiciones de los tres SNPs.



Fig. 6. Esquema que muestra el funcionamiento del cebador específico de alelo para la variante GAA (flecha). **A)** El cebador es 100% complementario a la secuencia diana, por lo que tendrá lugar la amplificación. **B)** El cebador discrimina a la otra variante porque su extremo 3' no puede unirse y por tanto no podrá ser extendido durante la PCR.

2.4. Técnicas de genotipado y haplotipado

Todas las reacciones de PCR realizadas se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. La elección de la enzima *Phire® Hot Start II DNA Polymerase* se basa fundamentalmente en que carece de actividad exonucleasa 5'→3', ya que en caso contrario degradaría a las sondas durante la fase de extensión, disminuyendo la concentración de fluoróforos y generando una caída progresiva en la señal de fluorescencia. Además, esta enzima presenta la característica de activarse de forma rápida a alta temperatura (*Hot Start*), además de alta procesividad y buena tolerancia a inhibidores de la PCR, como podrían serlo los fluoróforos, características que la vuelven deseable para estos ensayos.

Además, en cada ensayo de genotipado o de determinación de haplotipos se añadió un control negativo, que consistió en una muestra agua en lugar de ADN, para asegurar la ausencia de ADN contaminante.

2.4.1. Ensayos de genotipado mediante PCR a tiempo real

Durante 5 meses se realizaron ensayos rutinarios para determinar el genotipo de 148 pacientes para los dos locus de interés, en reacciones separadas, conforme iban llegando las muestras al laboratorio. Para llevar a cabo este propósito, se empleó el perfil térmico estándar y la siguiente mezcla maestra general por reacción, ya optimizada previamente en el laboratorio:

- | | | |
|--|---|-----------------------|
| ▪ Mezcla pre-mezcla* ¹ : 9,8 µl | } | Volumen final = 20 µl |
| ▪ Enzima Phire: 0,2 µl | | |
| ▪ Cebador directo (5 µM): 2µl | | |
| ▪ Cebador reverso (5 µM): 2µl | | |
| ▪ Sonda sensora* ² (4 µM): 2µl | | |
| ▪ Sonda ancla* ² (4 µM): 2µl | | |

*¹La pre-mezcla consiste en una mezcla previa de agua, nucleótidos, magnesio y tampón Phire en las proporciones adecuadas según especificaciones del fabricante.

*² Se emplearon dos parejas de sondas: una específica para el locus TCG>GAA y otra específica para el locus T>C.

2.4.2. Resolución de haplotipos en dobles heterocigotos

Con el fin de averiguar el haplotipo en los individuos dobles heterocigotos (muestras problema), se diseñó un experimento en el cual se combinaron los ASP con el cebador reverso del locus T>C, para obtener un solo amplicón que incluya ambas regiones. La amplificación selectiva del alelo TCG o del alelo GAA mediante AS-PCR permitiría en el siguiente paso centrar el análisis solamente en el alelo presente en el locus T>C que esté ligado a la primera variante.

2.4.2.1. Prueba de cebadores específicos de alelo en PCR convencional

El primer paso de este diseño experimental consistió en realizar un ensayo, mediante PCR convencional, para determinar la especificidad y capacidad de discriminación de los cebadores ASP-GAA y ASP-TCG, probando un rango de temperatura de anillado entre 55°C y 68°C. La temperatura óptima para la amplificación selectiva se determinó utilizando como patrones una muestra homocigótica TCG y otra homocigótica GAA, en reacciones separadas y con diferentes ASPs, analizando los resultados mediante electroforesis. Estas muestras se eligieron de entre de los ensayos rutinarios. Para cada cebador se esperaba que solo una de las muestras amplifique, en tanto que la otra, al no poder ser amplificada, serviría de control de discriminación. El esquema del diseño se ha representado gráficamente en la Fig. 7 para uno de los cebadores.

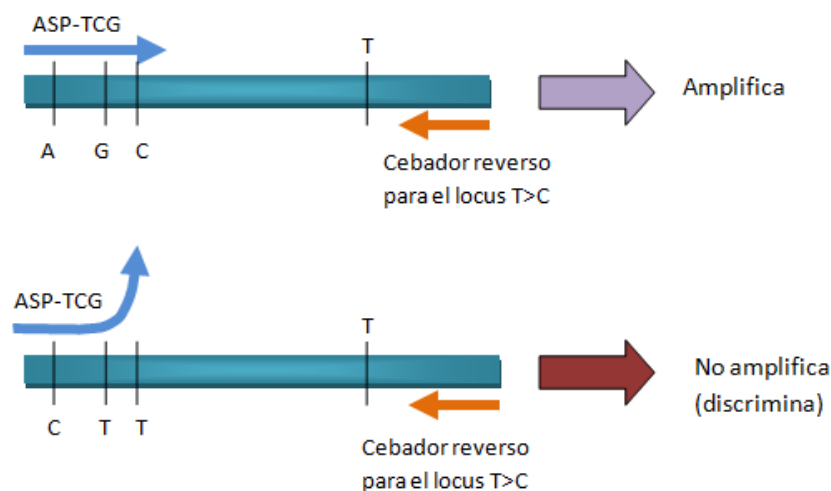


Fig. 7. Esquema de un ejemplo de AS-PCR empleando el cebador ASP-TCG y el cebador conservado.

Las reacciones de amplificación fueron incubadas en un termociclador siguiendo la receta de la mezcla maestra general indicada más arriba, pero probando dos concentraciones de cebadores: 2 μM y 5 μM , y sustituyendo el volumen de sondas por agua.

El análisis por electroforesis se preparó de la siguiente manera:

- Gel agarosa al 1,5%; tampón TBE 1X; voltaje constante (90 mV).
- 10 μl ADN + 2 μl tampón de carga 6X que contiene bromofenol y xilanocianol.
- Marcador de peso molecular 100 pb.

El resultado de la electroforesis se visualizó mediante tinción del ADN con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta.

2.4.2.2. Optimización del uso de cebadores específicos de alelo en PCR a tiempo real

Una vez seleccionadas las condiciones de amplificación mediante PCR convencional, en principio orientativas, se reprodujo el mismo experimento pero añadiendo a las mezclas de reacción (máster) las sondas diseñadas para el locus T>C, para poder visualizar la capacidad de discriminación de ambos ASP mediante el seguimiento de la amplificación a tiempo real. Además, se aumentó el número de réplicas de las muestras homocigóticas de referencia: 3 para la variante que debería amplificar y 1 para la otra variante, que actuaría como control de discriminación (Fig. 8).

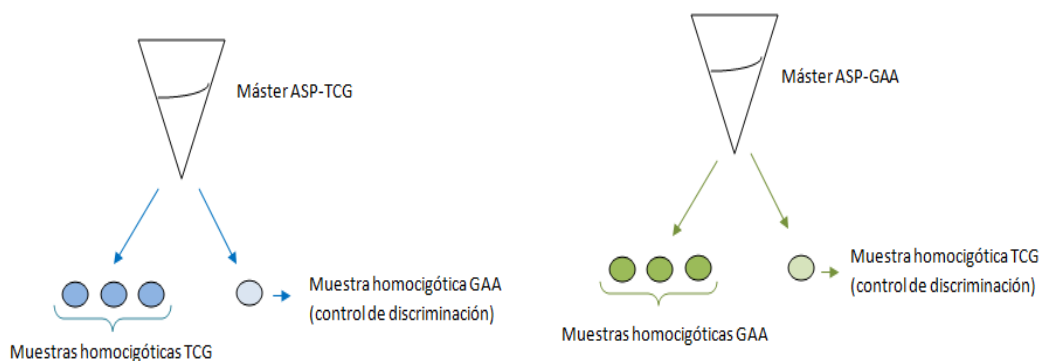


Fig. 8. Representación esquemática de la prueba de los ASPs mediante PCR a tiempo real. Se realizaron 3 réplicas de la muestra que debería amplificar y un control de discriminación para ensayar con cada cebador.

Con el fin de continuar afinando las condiciones de amplificación y discriminación, se volvió a reproducir el mismo esquema experimental anterior, pero ensayando variaciones en la temperatura de anillado y la concentración de cebadores y sondas.

2.4.2.3. Obtención artificial de una muestra con haplotipo conocido

El siguiente paso en la puesta a punto del método para resolver la ambigüedad de fase en los individuos dobles heterocigotos, fue obtener un extracto de ADN_g a partir de dos individuos dobles homocigotos (GAA/C y TCG/T) para crear una muestra con haplotipos conocidos. El genotipo de esta muestra artificial fue verificado mediante PCR a tiempo real. Esta muestra artificial se empleó para comprobar la fiabilidad del método de haplotipado y para generar un perfil estándar que permitió identificar la variante presente en el locus T>C.

Para la extracción de ADN_g a partir de las muestras de sangre de los individuos seleccionados, se probaron dos métodos diferentes. El primero se basó en la purificación de las dos muestras por separado mediante un kit comercial (*E.Z.N.A® Blood DNA Mini Kit, Omega bio-tek*), de manera que al finalizar el protocolo se debe cuantificar el ADN obtenido y luego mezclar en las mismas proporciones. Además, también debe añadirse una cantidad de NaOH y Tris-HCl para igualar las condiciones de salinidad respecto a las muestras extraídas mediante el método de lisis alcalina.

El segundo método consiste en la extracción conjunta de ambas muestras mediante el protocolo de lisis alcalina ya explicado, pero duplicando las cantidades de NaOH y Tris-HCl. Para ello se obtuvo un disco de la muestra de cada paciente, ambos impregnados con una cantidad similar de sangre, y se introdujeron en el mismo tubo.

2.4.2.4. Resolución de las muestras problema: dobles heterocigotos

Se aplicó la técnica basada en PCR específica de alelo ya optimizada al conjunto de muestras dobles heterocigóticas obtenidas durante los ensayos de genotipado rutinarios. Tras el análisis de fusión, los resultados fueron comparados con el estándar generado a partir de la muestra artificial.

2.4.3. Cribado de una muestra poblacional aleatoria

Con el fin de averiguar si el haplotipo UGT1A7*4 está presente en la población canaria y aportar más datos a los resultados obtenidos con las muestras de la población de estudio, se realizó un cribado de 95 muestras de neonatos de la isla de La Palma. Este ensayo constó de dos partes:

- En primer lugar se determinó el genotipo para el locus TCG>GAA.
- En segundo lugar, se aplicó la técnica de haplotipado centrada en el alelo TCG.

3. Resultados y discusión

3.1. Ensayos de genotipado mediante PCR a tiempo real

Mediante estos ensayos pudieron determinarse los genotipos de los pacientes para los dos locus estudiados y especificar el riesgo asociado a intoxicación por irinotecán en aquellos casos en los que los haplotipos pudieron ser deducidos directamente. Para el locus TCG>GAA se probó tanto la sonda sensora salvaje como la mutante, en combinación con la misma sonda ancla, en reacciones separadas (Fig. 9). Asimismo, se probaron las sondas sensoras salvaje y mutante para el locus T>C (Fig. 10). Esta forma de proceder permitió genotipar las muestras por dos vías diferentes que deberían aportar el mismo resultado. En este último caso las imágenes generadas en los respectivos análisis de fusión son especulares entre sí.

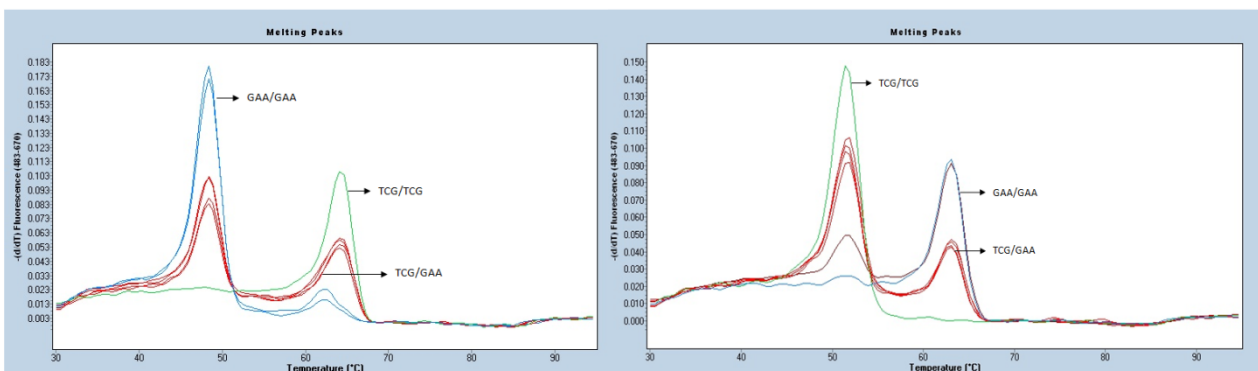


Fig. 9. Ejemplos de resultados de genotipado del locus TCG>GAA mediante análisis de fusión. Izquierda: sonda sensora diseñada para la variante TCG. Derecha: sonda sensora diseñada para la variante GAA. Las muestras que producen un solo pico de fusión son homocigóticas para uno u otro alelo (indicado con flechas), y las que conducen a dos picos son heterocigóticas.

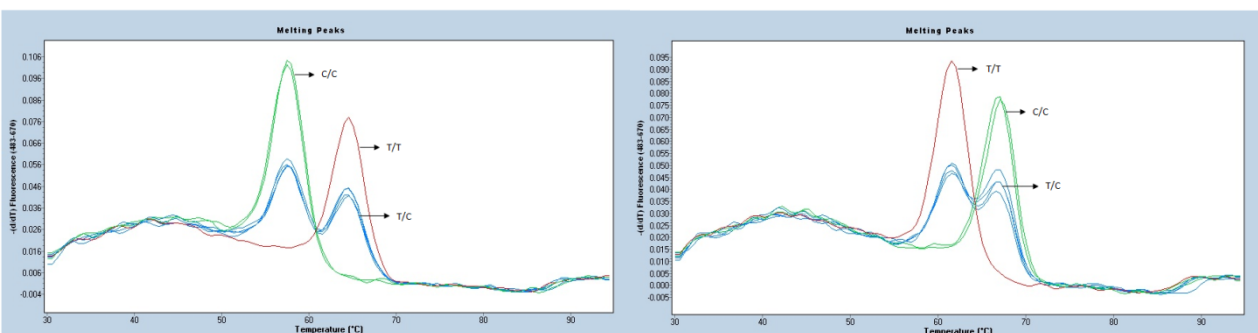


Fig. 10. Ejemplos de resultados de genotipado del locus T>C mediante análisis de fusión. Izquierda: sonda sensora diseñada para la variante T. Derecha: sonda sensora diseñada para la variante C. Las muestras que producen un solo pico de fusión son homocigóticas para uno u otro alelo (indicado con flechas), y las que conducen a dos picos son heterocigóticas.

Los resultados numéricos globales derivados de estos ensayos de genotipado se muestran en la Tabla 6. Estos fueron clasificados en base a su riesgo de intoxicación frente al irinotecán.

Haplotipo	Toxicidad	Resultado numérico	Porcentaje
*3/*3	Grave	20	13,51
*3/*2	Moderada	23	15,54
*2/*1	Nula	31	20,95
*2/*2	Nula	8	5,40
*1/*1	Nula	21	14,19
¿ *2/*4 o *1/*3 ?	?	45	30,41
		Total = 148	

Muestras problema →

Tabla 6. Resultados finales de los ensayos de genotipado. Se muestra el número de pacientes por combinación de haplotipos, el porcentaje de individuos, y el riesgo de intoxicación. Véase la equivalencia entre combinación de haplotipos y genotipos en Tabla 1.

Tal y como se observa en la Tabla 6, no se detectó el haplotipo UGT1A7*4 entre aquellos casos en los que las fases de las variantes genéticas pudieron ser deducidas directamente a partir de los datos de genotipo.

3.2. Resolución de haplotipos en dobles heterocigotos

Los ensayos conducentes a optimizar la técnica de haplotipado propuesta comenzaron probando los cebadores específicos de alelo ASP-TCG y ASP-GAA mediante PCR convencional. En esta primera prueba se evaluó tanto el rendimiento de la amplificación (intensidad de la banda) como la especificidad de ambos cebadores, entendida como la capacidad para amplificar solo la variante para la que fueron diseñados y discriminar a la variante contraria. Un total de 12 ensayos de PCR fueron realizados en diferentes condiciones de temperatura y concentración de cebadores usando como patrón dos muestras homocigóticas para la variante TCG o la GAA. Cada uno de estos ensayos constó de 4 reacciones siguiendo el esquema representado en la figura 11. Los resultados de este proceso de optimización se muestran en la Fig. 12. A partir de ellos se consideró que las condiciones más adecuadas para el posterior empleo de las sondas fueron una temperatura de anillado de 60°C y una concentración de cebadores de 2 µM.

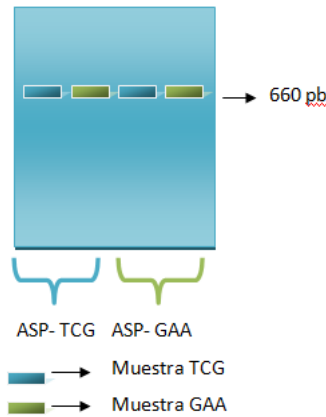


Fig. 11. Organización de los ensayos de optimización de la AS-PCR.

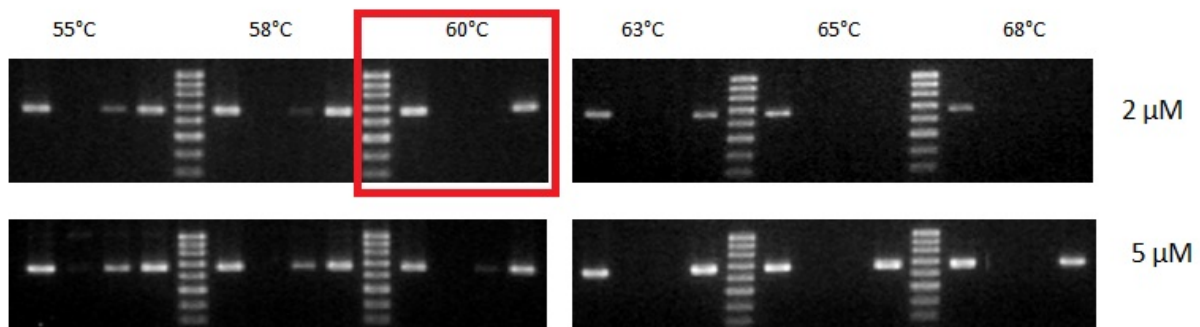


Fig. 12. Resultados de optimización de la AS-PCR analizado mediante electroforesis en gel. Las condiciones elegidas como óptimas se enmarcan en rojo.

En una segunda etapa se intentó extrapolar a la plataforma de PCR a tiempo real las condiciones seleccionadas en los ensayos de PCR convencional. Para ello se incorporaron las sondas del locus T>C a la mezcla de reacción. El seguimiento de la amplificación con el transcurso de los ciclos, aunque un tanto irregular, permitió deducir que el cebador ASP-TCG era capaz de unirse al alelo TCG (aumento de la señal de fluorescencia), mientras que discriminaba perfectamente la variante GAA (señal de fluorescencia plana) (Fig. 13, A). En cambio, el cebador ASP-GAA se comportaba de manera no selectiva y bastante aleatoria (Fig. 13, B).

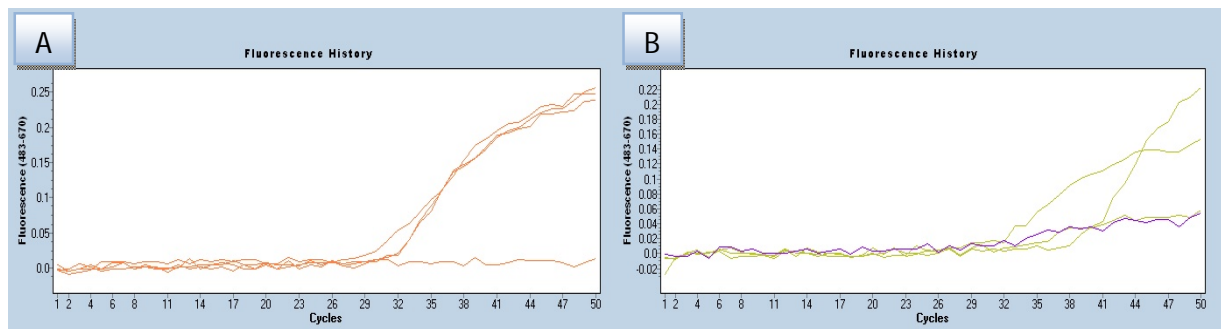


Fig. 13. Optimización de la AS-PCR tiempo real. A) El cebador ASP-TCG discrimina correctamente ya que las 3 réplicas de la muestra homocigótica TCG amplifican en tanto que la muestra homocigótica GAA no amplifica. **B)** Con el cebador ASP-GAA solo amplifica una de las réplicas de la muestra GAA, y a ciclos tardíos también logra unirse a la variante TCG, por lo que no ha sido capaz de discriminarla.

En vista del mal resultado obtenido con el cebador ASP-GAA, se planteó la posibilidad de probar otra combinación de temperatura de anillado (63°C) y concentración de cebadores ($5\ \mu\text{M}$) que había funcionado correctamente en los ensayos de AS-PCR convencional (Fig. 12), así como dos concentraciones diferentes de las sondas (2 y $4\ \mu\text{M}$). Durante el transcurso de este nuevo ensayo no se pudo hacer el seguimiento de la amplificación (Fig. 14) con ninguno de los dos ASPs. Esto podría atribuirse a que las sondas están diseñadas para unirse a una temperatura de 60 - 62°C , por lo que una temperatura de anillado superior implicaría que las sondas se separen antes de que el equipo registre la fluorescencia (se interrumpen fenómeno FRET), eliminando el principal atractivo de la PCR a tiempo real. Dada la imposibilidad de encontrar unas condiciones que permitan amplificar selectivamente el alelo GAA y realizar un seguimiento de la amplificación, se tomó la decisión de descartar el cebador ASP-GAA y continuar optimizando la técnica con el cebador ASP-TCG.

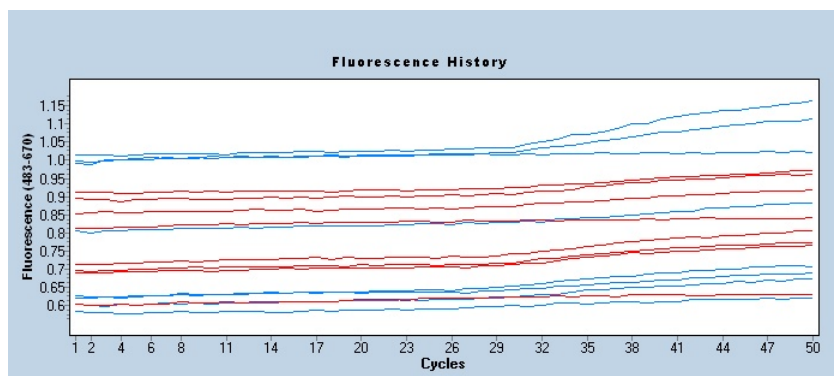


Fig. 14. Optimización de la AS-PCR tiempo real. Nótese lo defectuoso del seguimiento de la amplificación utilizando una temperatura de anillado de 63°C .

Dado que las condiciones empleadas para el ensayo de la figura 13 no fueron realmente óptimas para el cebador ASP-TCG, se decidió mantener la temperatura de anillado a 60°C , seleccionar la sonda que se une a la variante salvaje del locus T>C y probar diferentes concentraciones del cebador y de las sondas. Las condiciones finalmente escogidas fueron una concentración $5\ \mu\text{M}$ de cebador ASP-TCG y $2\ \mu\text{M}$ de sonda T. Como se muestra en la Fig. 15, el seguimiento de la amplificación mejoró notablemente y el análisis de fusión dio lugar a un pico bien definido que se correspondía con la variante T, lo esperado para la muestra doble homocigótica TCG/TCG -T/T usada como patrón (Fig. 16).

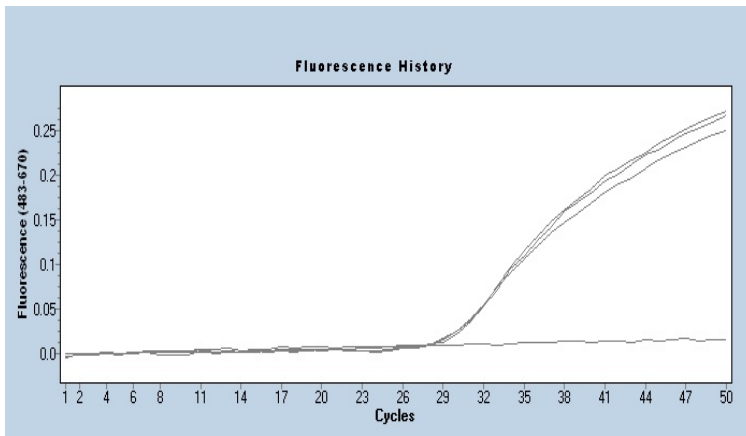


Fig. 15. Seguimiento a tiempo real de la amplificación del alelo TCG a tiempo real. El control de discriminación GAA/GAA no genera señal. Nótese la mejoría respecto a las condiciones de amplificación iniciales (Fig. 13, A).

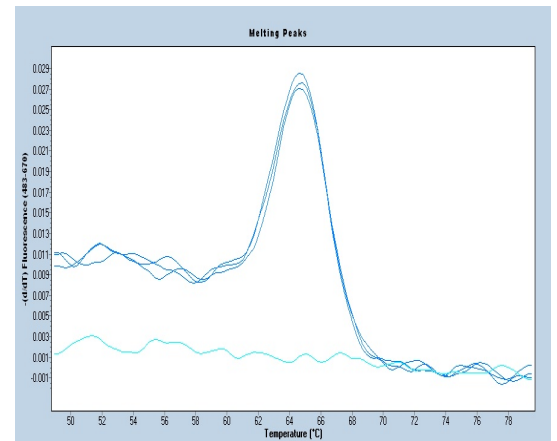


Fig. 16. Pico de fusión que se corresponde con la variante T en las muestras homocigóticas TCG/TCG. El control de discriminación GAA/GAA, en cambio, no genera señal.

Una vez optimizada la técnica de haplotipado, se precisa de un perfil estándar o de referencia que permita comparar con las muestras problema. Para la obtención de estos haplotipos de referencia se intentó generar un híbrido doble heterocigótico mediante dos metodologías diferentes. La primera de ellas conllevaba purificación de ADNg a partir de un muestra homocigótica para el haplotipo UGT1A7*1 y otra para el UGT1A7*3, pero no se obtuvieron los resultados esperados, ya que la cantidad de ADNg obtenido resultó ser insuficiente. La segunda opción consistió en extraer ambas muestras de manera conjunta mediante el protocolo de lisis alcalina. El ensayo de genotipado posterior reveló que efectivamente se había generado dicho híbrido y que los picos no resultaban muy dispares en lo que altura se refiere (Fig. 17). Tras la creación del híbrido se pasó a aplicar la técnica de haplotipado desarrollada, es decir, la amplificación selectiva del alelo TCG mediante AS-PCR a tiempo real y posterior análisis del locus T>C mediante la sonda T, y de esta manera para generar el estándar de haplotipado (Fig. 18). Este estándar sólo incluyó a la variante salvaje del locus T>C, ya que en los ensayos de genotipado previo nunca se detectó el haplotipo UGT1A7*4.

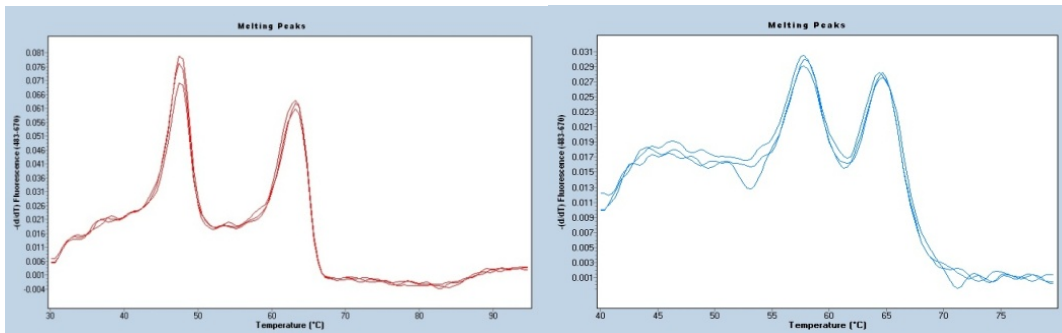


Fig. 17. Resultado del genotipado del híbrido doble heterocigótico. Izquierda: sonda salvaje para el locus TCG>GAA; Derecha: sonda salvaje para el locus T>C.

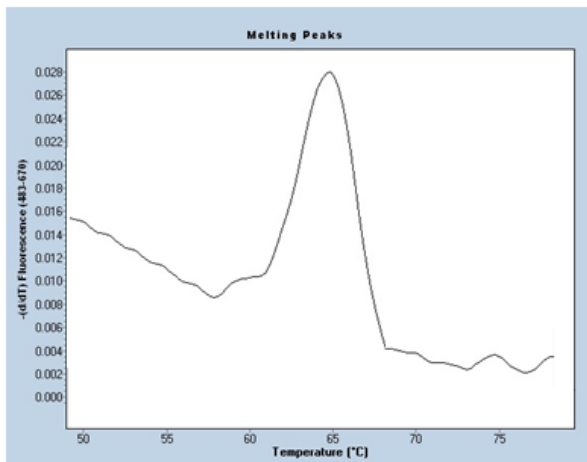


Fig. 18. Estándar de haplotipado obtenido a partir de la muestra híbrida. Solamente se muestra un pico que coincide con la variante T, ya que una de las muestras utilizadas para la creación del híbrido eran homocigótica TCG/TCG–T/T. El estándar ideal debería de contener ambos picos, el pico aquí mostrado y uno desplazado a su izquierda (variante C).

Una vez concluida la optimización de la técnica de haplotipado, se procedió a abordar el análisis de muestras problema dobles heterocigotos. En todos los casos, tras el análisis de fusión solo se obtuvo un pico que coincidía con el estándar de la variante T (Fig.19), lo que quiere decir que la fase de las variantes genéticas en todas estas muestras resultó ser TCG/T - GAA/C, es decir la combinación de haplotipos UGT1A7*1/*3. Dado que todos esos pacientes contienen el haplotipo UGT1A7*3 se les puede atribuir riesgo moderado de intoxicación por irinotecán.

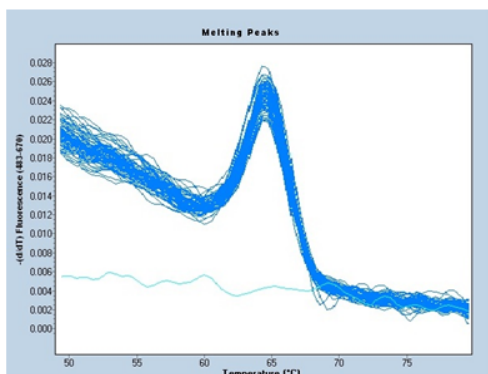


Fig. 19. Resultado de haplotipado de las muestras problemas dobles heterocigotos. En todos los casos la variante TCG estuvo ligada a la variante T.

En la tabla 7 se presenta un resumen final del riesgo de toxicidad frente al irinotecán en el conjunto de 148 pacientes analizados. Tal y como se refleja en dicha tabla, el riesgo alto de intoxicación por el fármaco parece presentar una mayor incidencia en la población de estudio que en la población de referencia, lo que podría indicar una mayor frecuencia del haplotipo UGT1A7*3 en la población tinerfeña.

Toxicidad Irinotecán	Número de pacientes	Porcentaje observado	Porcentaje de referencia
Grave	20	13,51	8,7
Moderada	68	45,95	45,95
Nula	60	40,54	43,5

Tabla 7. Resumen de la prevalencia de la toxicidad frente al irinotecán en una población clínica. Se indica los porcentajes de referencia tomados de la bibliografía (Tziotou *et al.*, 2014).

3.3. Cribado de una muestra poblacional aleatoria

Como resumen de los apartados anteriores en la población clínica analizada solo se han observado los haplotipos UGT1A7*1, UGT1A7*2 y UGT1A7*3. La no detección del haplotipo UGT1A7*4 podría ser debido a que no está presente en la población canaria o lo está con una frecuencia muy baja. En este sentido, se decidió ampliar el tamaño muestral de nuestro análisis incorporando 95 muestras de neonatos de la isla de La Palma. Como este análisis estuvo enfocado exclusivamente a la detección del haplotipo UGT1A7*4, primero se genotipó el locus TCG>GAA. Los resultados obtenidos se visualizan en la figura 20, y los datos numéricos se exponen en la Tabla 8.

Tras seleccionar todas aquellas muestras portadoras del alelo TCG (71 muestras) se realizó un segundo ensayo con nuestra técnica optimizada de haplotipado. Como resultado, se observó que los 71 individuos eran portadores del haplotipo UGT1A7*1. Puesto que de un total de 243 individuos (sumando pacientes y neonatos) no se ha detectado el haplotipo UGT1A7*4, se puede afirmar que su frecuencia en la población analizada es inferior al 0,2%.

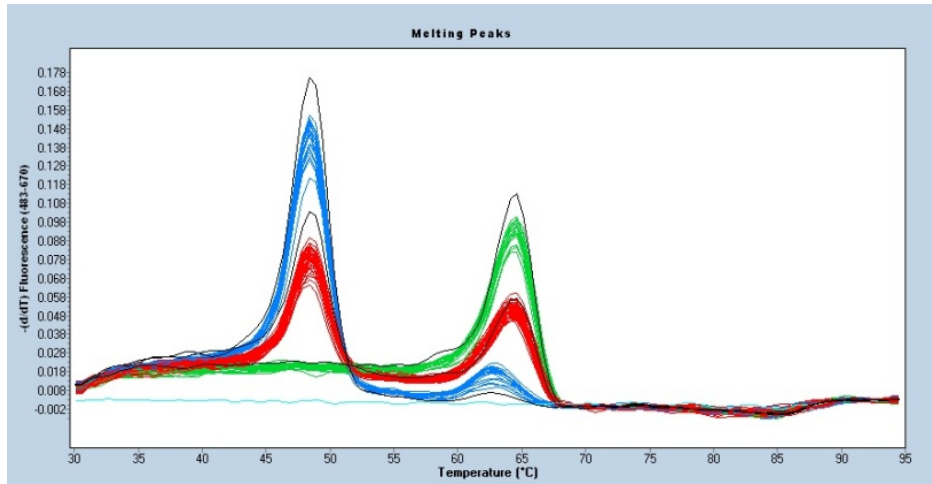


Fig. 20. Resultados del genotipado del locus TCG>GAA en 95 muestras de la isla de la Palma. Tras este ensayo se seleccionaron los portadores del alelo TCG (homocigóticos en verde y heterocigotos en rojo).

GAA/GAA	GAA/TCG	TCG/TCG
24	51	20

Tabla 8. Resultados numéricos del genotipado del locus TCG>GAA en 95 muestras de neonatos de la isla de La Palma.

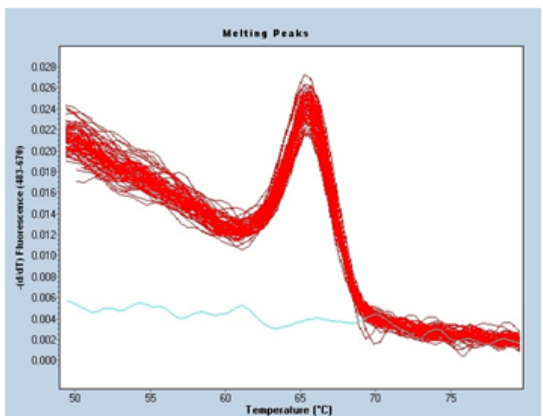


Fig. 21. Resultados del haplotipado de 71 muestras portadoras del alelo TCG. El pico de fusión se corresponde con el de la variante T, por tanto se trata del alelo UGT1A7*1.

3.4. Frecuencias alélicas

A partir de los resultados obtenidos, se calcularon las frecuencias alélicas para los loci TCG>GAA y T>C (Tablas 9 y 10), y se compararon con los datos extraídos de la base de datos de SNPs del NCBI basados en los resultados del proyecto 1000 genomas. Las frecuencias alélicas en el locus TCG>GAA en la muestra de la Palma no son significativamente diferentes a los referencias del NCBI ($\chi^2= 0,76$; $p > 0,5$), mientras que en la población clínica el caso de la población clínica son altamente significativas ($\chi^2= 15,63$; $p < 0,001$). En lo que se refiere al locus T>C, aunque no disponemos de datos de la población de La Palma, si podemos afirmar que las frecuencias alélicas en este locus y en la población clínica muestran diferencias muy significativas respecto a los datos de referencia del NCBI ($\chi^2= 7,24$; $p < 0,01$).

	Frecuencia alelo GAA	Frecuencia alelo TCG
NCBI	0,487	0,513
Población clínica	0,601	0,399
Neonatos La Palma	0,521	0,479

Tabla 9. Frecuencias alélicas en el locus TCG>GAA en la población de estudio y en la población de neonatos. Dichas frecuencias se comparan con las los tomadas de la base de datos del NCBI basadas en el proyecto 1000 genomas.

	Frecuencia alelo T	Frecuencia alelo C
NCBI	0,557	0,443
Población clínica	0,635	0,365

Tabla 10. Frecuencias alélicas en el locus T>C en la población de estudio. Las frecuencias observadas se comparan con las los tomadas de la base de datos del NCBI basadas en el proyecto 1000 genomas.

4. Conclusiones

- 1.-148 samples from oncological patients have been genotyped using fluorescent probes in a real-time PCR platform. The two analyzed loci are relevant to cancer chemotherapy.
- 2.- We have developed a technique to determine the haplotypes in double heterozygous patients by means of real-time allele-specific PCR. These samples represent 30,41% of patients and, therefore, the optimized technique is a useful diagnostic tool.
- 3.- UGT1A7*4 haplotype has not been detected in the study population.
- 3.- With the assistance of the optimized haplotyping approach, we have detected 20 patients with severe risk of intoxication with irinotecan and 68 with moderate risk.
- 4.-The allelic frequency in TCG>GAA and T>C loci from the *UGT1A7* gene in the clinical population are significantly different to those taken from the NCBI database.

5. Bibliografía

- Ahsen Von N**, Oellerich M, Schütz E (2000). Use of two reporter dyes without interference in a single-tube rapid cycle PCR: α 1-antitrypsin genotyping by multiplex real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clinical Chemistry* 46: 156-161.
- Carlini LE**, Meropol NJ., Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P, Wang H, and Blanchard RL, (2005). UGT1A7 and UGT1A9 Polymorphisms Predict Response and Toxicity in Colorectal Cancer Patients Treated with Capecitabine/Irinotecan. *Clinical Cancer Research* 11: 1226–1236.
- Cecchin E**, Innocenti F, D’Andrea M, Corona G, De Mattia E, Biondi P, Buonadonna A, and Toffoli G, (2009). Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7, and UGT1A9 Genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan. *Journal of clinical oncology* 27: 2457-2465.
- Creemers GJ**, Lund B, Verweij J. (1994). Topoisomerase I inhibitors: topotecan and irinotecan. *Cancer Treatment Reviews* 20:73-96.
- Di YM**, Chan E, Wei MQ, Liu JP, Zhou SF,(2009). Prediction of deleterious non-synonymous single-nucleotide polymorphisms of human uridine diphosphate glucuronosyltransferase genes. *The AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists) Journal*, 11: 469-80.
- Douillard JY**, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P, (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomized trial. *The Lancet* 355: 1041-1047.
- Jemal A**, Tiwari RC, Murray T, Ghafour A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ, (2004). Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 54:8– 29.
- Landt O**, (2001). Selection of hybridization probes for real-time quantification and genetic analysis. In: Rapid cycle real: methods and applications; pp. 35-41. Eds. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K-I, Springer.
- Lankisch TO**, Schulz C, Zwingers T, Erichsen TJ, Manns MP, Heinemann V, Strassburg CP,(2008). Gilbert’s syndrome and irinotecan toxicity: combination with UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 variants increases Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 695-701.
- Newton CR**, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF, (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 17: 2503-2516.
- Park SR**, Kong SY, Rhee J, Park YI, Ryu KW, Lee JH, Kim YW, Choi IJ, Kim CG, Lee JY, Cho SJ, Kim NK,(2011).Phase II study of a triplet regimen of S-1 combined with irinotecan and oxaliplatin in patients with metastatic gastric cancer: clinical and pharmacogenetic results. *Annals of Oncology* 22: 890–896.
- Rudbeck L**, Dissing J (1998). Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques* 25: 588-592.
- Schulz C**, Heinemann V, Schalhorn A, Moosmann N, Zwingers T, Boeck S, Giessen C, Stemmler HJ.(2009). UGT1A1 gene polymorphism: Impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 15: 5058-5066.

Strassburg CP, Vogel A, Kneip S, Tukey RH, Manns MP, (2002). Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. *Gut* 50:851–856.

Tziotou M, Kalotychou V, Ntokou A, Tzanetea R, Armenis I, Varsou M, Konstantopoulos K, Tsavaris N, Rombos Y,(2014). Polymorphisms of uridineglucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: low dose does not protect from toxicity. *Ecancermedicallscience*: <http://ecancer.org/journal/8/428-polymorphisms-of-uridine-glucuronosyltransferase-gene-and-irinotecan-toxicity-low-dose-does-not-protect-from-toxicity.php>

Valenzuela-Jiménez B, González-Sales M, Escudero-Ortiz V, Martínez-Navarro E, Pérez-Ruixo C, Rebollo-Liceaga J, González-Manzano R, Pérez-Ruixo JJ, (2013). Influencia de los polimorfismos genéticos en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* sobre la farmacocinética de irinotecán, SN-38 y SN-38G. *Farmacia Hospitalaria* 37:111-127.

Wheeler HE, Maitland ML, Dolan ME, Cox NJ and Ratain MJ, (2013). Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. *Nature Reviews Genetics* 14: 23-34.